

SELEKSI KETAHANAN TUNAS VANILI TERHADAP *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *VANILLAE* SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN TEKNIK DOUBLE LAYER

In Vitro Selection of Vanilla Againsts *Fusarium oxysporum*
f. sp. vanillae By Double Layer Technique)

Alfi Inayati¹, Bambang Hadisutrisno², Achmadi Priyatmojo².

Program Studi Fitopatologi
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Vanilla was an important commodity which had high economical values known susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* the cause of stem rot disease. Double layer technique used to select vanilla plantlet to *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*'s toxin, especially thermostable toxin. The experiment showed that 19.23% plantlets resisted to thermostable toxin produced by *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* at the first four weeks, but the growth of plantlets were inhibited. The inhibition was spesified by rossetting plantlet and no leave, root, and sucker initiation. Second selection showed 57.1% planlets resisted and the growth of plantlet still inhibited.

Keywords: *vanilla* – in vitro selection – double layer technique

PENGANTAR

Seleksi secara *in vitro* menggunakan teknik *double layer* dapat dimanfaatkan sebagai salah satu cara untuk mendapatkan vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) yang tahan *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Teknik ini telah dimanfaatkan untuk mendapatkan tanaman pisang yang tahan *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Karsinah *et al.*, 1999), tanaman gandum yang tahan *F. graminearum* dan *F. culmorum* (Ahmed *et al.*, 1991). Seleksi secara *in vitro* mempunyai beberapa kelebihan bila di bandingkan seleksi di lapangan yaitu dapat dilakukan pada ruang yang relatif sempit dengan tenaga kerja sedikit, kondisi lingkungan terkontrol sehingga kepastian hasil lebih terjamin dan memungkinkan dilakukannya pengukuran meskipun terdapat perbedaan kuantitatif yang mengendalikan ketahanan dan mampu menangani sejumlah besar individu pada daerah yang terbatas (Wenzel, 1985; Bolik *et al.*, 1986; Mc.Coy, 1988 *cit.* Wenzel dan Wehr, 1993).

1) Muhajirin RT IV/25, Dasan Agung, Mataram NTB

2) Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

CARA PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama bertujuan untuk perbanyakkan plantlet sebagai bahan untuk seleksi ketahanan pada tahap kedua. Pada tahap ini plantlet dikulturkan pada medium vacin and went (Torres, 1957) yang dimodifikasi dengan menambahkan ekstrak pisang dan air kelapa serta benzil amino purin (BAP) 1 ppm. Bahan tanam yang digunakan pada tahap ini berasal dari biji vanili yang dikecambahkan dan subkultur dari plantlet dengan 1 buku.

Tahap kedua adalah melakukan seleksi ketahanan dengan teknik *double layer* (Ahmed *et al.*, 1991) yang dimodifikasi. Seleksi dilakukan dalam tiga tahap, yaitu seleksi tahap pertama, pemulihan dan multiplikasi plantlet pada medium tumbuh kemudian dilanjutkan dengan seleksi tahap kedua. Sebelum seleksi dilakukan yang hal pertama yang harus dipersiapkan adalah pembuatan medium *double layer*. Medium *double layer* adalah medium yang terdiri dari dua lapis; lapisan pertama terdiri dari medium untuk pertumbuhan jamur patogen dalam hal ini untuk *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* digunakan medium potato dextrose agar (PDA), sedangkan lapisan yang kedua adalah medium untuk pertumbuhan plantlet, pada penelitian ini digunakan medium vacin and went (VW) (Torres, 1957). Cara pembuatan medium *double layer* adalah sebagai berikut, pertama botol kultur diisi 15 ml medium PDA. Setelah 1 minggu, medium diinokulasi dengan miselium *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari. Biakan *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk membunuh sel-sel jamurnya. Medium dibiarkan selama 2-3 jam, setelah dingin dan mengandung senyawa toksin yang termostabil, selanjutnya di atas lapisan tersebut dilapisi dengan medium pertumbuhan vanili yaitu VW yang telah disterilisasi sehingga terbentuk *double layer*.

Apabila 1 minggu tidak terjadi kontaminasi, plantlet vanili ditanam pada medium *double layer* tersebut dan diamati pertumbuhan serta ketahanannya terhadap *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Plantlet yang masih hidup selama 4 minggu (Ro) pada medium *double layer* selanjutnya disubkulturkan ke medium multiplikasi tunas atau regenerasi plantlet yaitu VW + BAP 1 ppm untuk pemulihan dan multiplikasi tunas. Setelah 4 minggu plantlet tersebut ditumbuhkan kembali ke medium *double layer* untuk seleksi tahap kedua. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah persentase plantlet yang hidup, kenampakan plantlet secara visual meliputi; warna plantlet yang terbentuk,

anakan, dan jumlah plantlet yang tahan terhadap *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil seleksi menggunakan teknik *double layer* pada plantlet vanili menunjukkan adanya plantlet yang mempunyai ketahanan terhadap *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Tabel 1 menunjukkan bahwa sampai minggu keempat plantlet vanili yang ditanam pada medium seleksi dengan teknik *double layer* mampu bertahan hidup. Keadaan ini menunjukkan bahwa ada harapan plantlet-plantlet tersebut mempunyai ketahanan terhadap *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

Tabel 1. Pertumbuhan plantlet pada seleksi tahap pertama menggunakan teknik *double layer*

| Minggu ke- | Jumlah plantlet hidup* | Kenampakan visual | | | |
|------------|------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|---------------|
| | | Warna | Jumlah daun | Jumlah akar | Jumlah anakan |
| I | 92,30% | H (15,38%), HC (73,08%) C (7,70%) | 0 | 0 | 0 |
| II | 80,77% | H (11,54%), HC (69,23%) C (19,23%) | 0 | 0 | 0 |
| III | 53,84% | H (7,70%), HC (46,15%) C (46,15%) | 0 | 0 | 0 |
| IV | 19,23% | H (3,85%), HC (15,38%) C (80,77%) | 0 | 0 | 0 |

Keterangan :

* : Plantlet yang ditanam untuk tiap perlakuan adalah 25

H : Hijau

HC : Hijau dengan bagian tertentu berwarna coklat

C : Coklat (*Browning*)

Plantlet yang tidak mampu hidup hingga akhir seleksi telah menunjukkan pertumbuhan yang kurang baik sejak awal seleksi, yaitu menjadi coklat terutama pada bagian plantlet yang bersentuhan dengan medium. Bagian plantlet yang berwarna coklat tersebut kemudian berkerut dan mengering. Pada beberapa plantlet meskipun bagian bawah telah berwarna coklat tetapi bagian atas atau shoot masih berwarna hijau, apabila keadaan seperti ini bertahan hingga minggu keempat maka bagian yang masih berwarna hijau tersebut diambil untuk pemulihan dan multiplikasi pada medium VW tanpa toksin.

Terhambatnya pertumbuhan dan perkembangan plantlet terlihat sejak minggu ke-1 setelah plantlet dipindahkan ke medium dan meningkat pada minggu kedua.. Hal ini menunjukkan bahwa periode kritis plantlet terhadap toksin yang terdifusi pada medium terjadi pada 2 minggu pertama seleksi, apabila plantlet tahan hingga minggu kedua ini kemungkinan besar plantlet tersebut dapat tahan hidup hingga akhir seleksi pada minggu keempat.

Secara visual plantlet yang tahan dapat dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu 3,85% berwarna hijau, pertumbuhan normal atau agak roset dan 15,38% berwarna coklat atau *browning* pada bagian dasar yang bersentuhan dengan medium sedangkan bagian atas atau shoot yang tidak bersentuhan dengan medium masih tetap hijau. *Browning* ini terjadi sebagai tanggapan plantlet terhadap toksin termotabil dari *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* yang terdifusi dalam medium. Plantlet mengeluarkan senyawa fenol yang kemudian mengalami reaksi oksidasi dengan toksin dari patogen. Senyawa fenol ini dapat berperan dalam ketahanan terhadap penyakit pada tumbuhan baik tumbuhan sehat maupun yang sakit, tetapi sintesis atau akumulasinya dipercepat setelah terjadi infeksi oleh patogen (Misaghi, 1982)

Setelah 4 minggu, plantlet kemudian dipindahkan ke medium VW untuk pemulihan dan multiplikasi. Plantlet yang mengalami stres pada perlakuan *double layer* diharapkan dapat pulih kembali pertumbuhannya menjadi normal apabila dipindahkan ke medium tanpa toksin yang merupakan medium tumbuhnya. Selain itu pemindahan ke medium tanpa toksin juga bertujuan untuk memproduksi jumlah plantlet yang lebih banyak atau multiplikasi, karena itu pada medium multiplikasi ditambahkan zat pengatur tumbuh dari kelompok sitokinin yaitu BAP 1 ppm. Sembilan plantlet yang tahan pada seleksi tahap pertama kemudian disubkultur yaitu dengan memotong-motong plantlet yang ukurannya sudah cukup besar yaitu telah memiliki lebih dari dua buku sehingga diperoleh jumlah plantlet yang lebih banyak.

Pertumbuhan plantlet setelah dipindahkan ke medium tanpa toksin ternyata masih lambat, bahkan beberapa plantlet mati akibat *browning* maupun karena mengalami maserasi yaitu jaringan menjadi lunak, mengandung banyak air dan menyebabkan kolapsnya jaringan. Jaringan yang mengalami maserasi tampak berwarna pucat dengan daun tipis dan transparan, keadaan ini menyebabkan plantlet menjadi lemah dan mudah mati. Pertumbuhan plantlet pada medium multiplikasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pertumbuhan plantlet vanili pada tahap multiplikasi

| Minggu ke- | Jumlah Plantlet hidup* | Rerata Jumlah daun | Rerata Jumlah akar | Rerata Jumlah anakan | Keterangan |
|------------|------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------------|
| I | 85,7% | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2 plantlet pucat |
| II | 78,6% | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1 plantlet <i>browning</i> |
| III | 71,5% | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1 plantlet <i>browning</i> |
| IV | 57,1% | 1,58 | 0,19 | 0,31 | |
| V | 57,1% | 1,69 | 0,19 | 0,53 | |
| VI | 57,1% | 1,69 | 0,19 | 0,53 | |

Keterangan *: jumlah plantlet yang ditanam pada awal multiplikasi 14

Hingga minggu ke-2 pada medium multiplikasi pertumbuhan plantlet masih lambat. Plantlet belum membentuk daun, akar maupun anakan. Keadaan ini disebabkan karena selama ditumbuhkan pada medium seleksi plantlet terhambat pertumbuhannya oleh toksin termotabil yang terdapat pada medium. Setelah minggu keempat, beberapa plantlet mulai membentuk daun maupun anakan. Kemampuan plantlet untuk bertahan hidup, bermultiplikasi dan beregenerasi dipengaruhi beberapa faktor seperti asal eksplan, fase fisiologis dari eksplan yang digunakan, konsentrasi hormon endogenus dan kondisi umum dari kultur; misalnya garam-garam mineral yang terdapat pada medium, karbohidrat, cahaya dan temperatur (Hu dan Wang, 1983). Selain itu toksin termotabil yang dihasilkan oleh *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* juga mengandung metabolit sekunder lain yang menghambat pertumbuhan plantlet dan telah terdifusi kedalam jaringan plantlet, akibatnya meskipun telah dipindahkan ke medium yang tanpa filtrat pertumbuhannya masih terhambat dan membutuhkan waktu untuk dapat tumbuh normal.

Pertumbuhan dan kemampuan hidup plantlet yang ditumbuhkan pada medium *double layer* apabila dibandingkan dengan pertumbuhan plantlet pada medium kontrol relatif rendah yaitu hanya 19,23% sedangkan kontrol 100%. Dengan demikian teknik *double layer* dapat digunakan untuk seleksi ketahanan vanili terhadap *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* secara *in vitro* dan dapat diharapkan menghasilkan varian-varian baru yang tahan terhadap *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Karsinah *et al.* (1999) dengan menggunakan teknik *double layer* untuk seleksi ketahanan pisang terhadap *F. oxysporum* f. sp. *cubense* memberikan hasil tanaman pisang yang tahan *F. oxysporum* f. sp. *cubense* setelah diaplikasikan ke lapangan.

Mekanisme kerja toksin termostabil yang dihasilkan oleh *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* dalam patogenesitas pada tanaman vanili belum diketahui dengan jelas. Penelitian dengan menggunakan filtrat dari *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* juga menunjukkan adanya penghambatan pada pertumbuhan plantlet vanili, hal ini menunjukkan bahwa toksin yang dihasilkan oleh *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* baik yang bersifat termostabil maupun tidak mempunyai peran dalam patogenesitas pada tanaman vanili. Beberapa penelitian tentang pengaruh toksin yang dihasilkan oleh spesies *Fusarium* menunjukkan bahwa toksin yang dihasilkan dapat menyebabkan terjadinya klorosis pada daun dan batang mengalami etiolasi (Krasil'nikov dan Kulbitskaya, 1956 cit. Anonim, 2002), dan menghasilkan enzim yang mampu mendegradasi *polygalacturonic acid* yang menyebabkan dinding sel tanaman rusak (Sengbusch, 2003).

Untuk memperoleh plantlet yang mempunyai sifat tahan yang relatif stabil maka setelah mengalami pemulihan pada medium multiplikasi plantlet diseleksi kembali pada medium yang sama dengan medium untuk seleksi tahap pertama. Pengujian kembali ini penting dilakukan mengingat besarnya peluang timbul keragaman atau variasi baru yang terjadi selama tanaman ditanam secara *in vitro* yang dikenal sebagai variasi somaklonal. Variasi somaklonal yang timbul ini bisa menghasilkan plantlet baru yang lebih tahan atau malah sebaliknya ketika tahan pada seleksi tahap pertama dapat berubah menjadi rentan pada seleksi tahap kedua. Variasi somaklonal inilah yang juga banyak dimanfaatkan untuk memperoleh plantlet-plantlet yang tahan terhadap penyakit atau memperoleh plantlet baru yang mempunyai sifat unggul yang tidak dimiliki tanaman induknya. Timbulnya variasi somaklonal ini antara lain disebabkan oleh metode perbanyakan yang digunakan, jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan, macam jaringan yang digunakan, asal bahan untuk kultur, dan jumlah subkultur yang dilakukan (Pierik, 1987). Karena vanili diperbanyak secara vegetatif maka apabila telah diperoleh plantlet yang tahan maka upaya untuk mendapatkan tanaman yang tahan dalam jumlah banyak akan lebih mudah. Sifat tahan yang ada pada plantlet hasil seleksi *in vitro* dapat diturunkan pada progeni berikutnya terlebih pada tanaman yang diperbanyak secara vegetatif.

Pada seleksi tahap kedua ini ternyata plantlet yang tahan cukup tinggi seperti terlihat pada Tabel 3. Delapan plantlet hasil multiplikasi yang kemudian dipotong menjadi 12 plantlet; 9 plantlet mampu tahan pada seleksi tahap kedua.

Tabel 3. Pertumbuhan plantlet pada seleksi tahap kedua dengan teknik *double layer*

| Minggu ke- | Jml plantlet hidup* | Rerata jml daun | Rerata jml akar | Rerata jml anakan |
|------------|---------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| I | 83,33% | 1,54 | 0,08 | 0,66 |
| II | 83,33% | 1,54 | 0,08 | 0,66 |
| III | 75% | 1,54 | 0,08 | 0,875 |
| IV | 75% | 1,54 | 0,08 | 0,875 |
| V | 75% | 1,54 | 0,08 | 0,875 |

Keterangan * : jumlah plantlet yang ditanam mula-mula 12

Pertumbuhan plantlet pada seleksi tahap kedua menunjukkan kenampakan visual yang lebih baik dari pertumbuhan pada seleksi tahap pertama. Plantlet sudah mulai membentuk daun, akar dan anakan meskipun jumlahnya relatif rendah. Keadaan ini menunjukkan meningkatnya kemampuan plantlet untuk mengatasi tekanan akibat toksin termostabil yang dihasilkan *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Plantlet yang tahan pada seleksi tahap kedua ini kemudian ditumbuhkan kembali pada medium tumbuh yaitu VW untuk pemulihan dan multiplikasi. Untuk mendapatkan tanaman vanili yang mempunyai sifat tahan yang stabil maka pengujian selanjutnya dapat dilakukan pada waktu aklimatisasi atau saat memindahkan tanaman ke lapangan, yaitu dengan menanam tanaman vanili pada tanah yang terinfeksi *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Untuk mendapatkan varietas vanili yang tahan dibutuhkan waktu yang cukup lama. Pada perbanyakan vanili dengan teknik *in vitro* untuk menghasilkan plantlet yang siap diaklimatisasi membutuhkan waktu lebih kurang 15 bulan dan dapat menjadi lebih lambat apabila ditambahkan perlakuan lain seperti pemberian toksin pada medium. Meskipun demikian apabila telah diperoleh varietas yang tahan maka pengembangannya relatif lebih mudah karena vanili mudah diperbanyak secara vegetatif baik secara *in vitro* melalui mikropropagasi maupun stek di *green house*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Teknik *double layer* dapat digunakan untuk seleksi ketahanan vanili terhadap *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* karena toksin termostabil yang terdapat dalam medium *double layer* berperan dalam patogenesitas *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

- Hasil seleksi tahap pertama menunjukkan 19,28% plantlet tahan terhadap *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* sedangkan pada seleksi tahap kedua 57,1% plantlet tahan.

Saran

- Perlu penelitian lebih lanjut mengenai macam dan konsentrasi toksin termostabil yang terdapat pada *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* yang berperan dalam patogenesitas serta dosis letal untuk seleksi ketahanan secara *in vitro*
- Plantlet-plantlet yang tahan pada seleksi *in vitro* sebaiknya diuji lagi untuk mendapatkan ketahanan yang lebih stabil. Pengujian dapat dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan kombinasi beberapa komponen seleksi yang lain seperti filtrat dari patogen maupun dengan toksin yang telah dimurnikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, Z.K., A. Mesterhazy, dan F. Sagi. 1991. In Vitro Techniques for Selecting Wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium*-resistance. I. Double Layer Culture Technique. *Euphytica* 57:251-257
- Anonim. 2002. Mycotoxins Produced by *Fusarium* Species. www.mycotoxinside.net/HEALTH/MYCOTOXIN/Soil_Contamination/htm
- Hu, C. Y. dan P. J. Wang. 1983. Meristem, Shoot Tip and Bud Culture. Evans. D. A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, Y. Yamada. (ed). *Hand Book of Plant Cell Culture*. Vol 1: 177-217. Macmillan Publ & Co. New York.
- Karsinah, Sunyoto, Jumjunidang dan Nurhadi. 1999. Teknik Kultur *Double-layer* untuk seleksi *In-Vitro* Pisang Tahan *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*. *Jurnal Hortikultura*, 9(2); 93-98
- Misaghi, I. J., 1982. *Physiology and Biochemistry of Plant-Pathogen Interactions*. Plenum Press. New York and London
- Pierik, R. L. M., 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publisher. Netherlands
- Sengbusch, P. V. 2003. Molecular and Genetic studies of Interactions between Plants and Fungi; The Effects of Toxins, Phytoalexins, Hypersensitivity, and Resistance. www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e33/33d.htm -17-
- Torres, K.C. 1957. *Tissue Culture Techniques of Horticultural Crops*. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Wenzel, G. dan B.F. Wehr. 1993. *In Vitro Selection dalam Plant breeding: Principles and Prospect*. Chapman & Hall. London. 353-370

- Naskah harus berupa sebagian atau seluruh hasil penelitian Magister (S-2).
 - Naskah ditulis dalam bahasa Indonesia dengan *Abstract* bahasa Inggris atau dalam bahasa Inggris dengan *Intisari* bahasa Indonesia. *Abstract* atau *Intisari* tidak lebih dari 250 kata dengan disertai 3-5 istilah kunci (*key word*). Naskah berupa *print out* dan rekaman dalam cakram komputer dengan jumlah maksimal 12 halaman ketikan kuarto spasi ganda dan pias 2,5 cm, termasuk tabel dan gambar.
 - Sistematika penulisan disusun dengan urutan sebagai berikut.
 - judul, nama penulis, dan nama program studi,
 - abstract* atau *intisari* dan *key word* atau kata kunci,
 - batang tubuh: (1) pengantar yang berisi permasalahan termasuk tinjauan pustaka, (2) cara penelitian, (3) hasil dan pembahasan, (4) kesimpulan dan (5) ucapan terima kasih (jika ada).
 - daftar pustaka
 - Judul diusahakan cukup informatif dan tidak terlalu panjang. Judul yang terlalu panjang harus disusun menjadi judul utama dan anak judul.
 - Nama (nama-nama) penulis (tanpa gelar) diberi indeks (superscript) 1, 2, 3, dan seterusnya lalu diikuti dengan nama program studi Program Pascasarjana UGM. Pada bagian bawah halaman judul dicantumkan penjeleasan tentang alamat instansi penulis atau alamat rumah bagi belum bekerja sesuai indeks yang diberikan.
 - Tabel dan gambar harus diberi nomor dan judul serta keterangan yang jelas. Tabel ditempatkan sedekat-dekatnya dengan pembahasan. Gambar harus asli, jelas, ukuran maksimal 12 cm x 19 cm dan dibuat terpisah (tidak ditempelkan dalam naskah). Di bagian belakang gambar ditulis dengan pensil: judul naskah dan nama penulis. Foto berwarna dapat diterima dengan catatan biaya pencetakan ditanggung oleh penulis.
 - Pengacuan pustaka dilakukan dengan sistem nama-tahun, contoh:
 - * Menurut Griffin (1994)
 - * Seperti dikemukakan peneliti terdahulu (Sudigdo, 1972; Putranto, 1974 cit. Sudirman, 1983), tempe bongkreng
 - Daftar pustaka ditulis dalam urutan abjad secara kronologis:
 - ke bawah: menurut abjad nama akhir penulis pertama
 - ke kanan:
 - Untuk buku: nama akhir dan inisial penulis, tahun terbit, judul, jilid, edisi, nomer halaman yang diacu, nama penerbit, tempat penerbit.
 - Untuk tulisan karangan dalam buku: nama akhir dan inisial penulis, tahun terbit, judul tulisan, inisial dan nama akhir editor: judul buku, halaman permulaan dan akhir karangan, nama penerbit, tempat penerbit.
 - Untuk tulisan dalam majalah atau jurnal: nama akhir dan inisial penulis, tahun, judul tulisan, singkatan re, nama majalah/jurnal, jilid, (nomor), nomer halaman yang diacu.
 - Untuk tulisan dalam pertemuan ilmiah: nama akhir dan inisial penulis, tahun, judul tulisan, singkatan nama pertemuan (penyelenggara), waktu, tempat pertemuan.
- Contoh:
- Soemarwoto, O. 1988. *Analisis Mengenai Dampak Lingkungan*. Gadjah Mada Univ. Press, Yogyakarta
- Griffin, D.H. 1994. *Fungal Physiology*. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Hampton, R., E. Balls and S. De Boer (eds.) 1990. *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens: A Laboratory Manual*. APS Press, St. Paul.
- Lis, W.J. and C.E. Warren. 1980. Ecology of Aquatic System. In: *Fisheries Management*. R.T Lackey and L.A. Nielsen (eds.), pp. 41-80. Blackwell Scientific, New York.
- Ellis, R.J. 1981. Chloroplast Proteins: Synthesis, Transport, and Assembly. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 111-137.
- Dalam tata-nama (nomenklatur) dan tata-istilah, penulis harus mengikuti cara penulisan yang baku untuk bidang keilmuan masing-masing.